

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

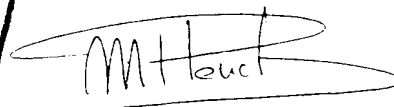
COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **27 AVR. 1998**

PRIORITY DOCUMENT

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département



Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

<p>DATE DE REMISE DES PIÈCES 28.01.98</p> <p>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL 98 00927-</p> <p>DEPARTEMENT DE DÉPÔT 75</p> <p>DATE DE DÉPÔT 28 JAN. 1998</p>		<p>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</p> <p>Cabinet ARMENGAUD AINE</p> <p>3, Avenue Bugeaud</p> <p>75116 PARIS</p> <p>n° du pouvoir permanent 59269 références du correspondant 59269 téléphone</p>									
<p>2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire</p> <p><input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen</p> <p><input type="checkbox"/> demande initiale</p> <p><input type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n°</p> <p>Établissement du rapport de recherche <input checked="" type="checkbox"/> diffère <input type="checkbox"/> immédiat</p> <p>Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non</p> <p>Titre de l'invention (200 caractères maximum)</p> <p>Niveaux polypeptides associés à des récepteurs activateurs et leurs applications biologiques</p>		<p>3 DEMANDEUR (S) n° SIREN code APE-NAF</p> <p>Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination</p> <p>INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (I.N.S.E.R.M.)</p> <p>Nationalité (s) Française</p> <p>Adresse (s) complète (s)</p> <p>101 rue de Tolbiac</p> <p>75654 PARIS CEDEX 13</p> <p>En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre <input type="checkbox"/></p>									
<p>4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée</p>		<p>5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission</p>									
<p>6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 25%;">pays d'origine</th> <th style="width: 25%;">numéro</th> <th style="width: 25%;">date de dépôt</th> <th style="width: 25%;">nature de la demande</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>				pays d'origine	numéro	date de dépôt	nature de la demande				
pays d'origine	numéro	date de dépôt	nature de la demande								
<p>7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° date n° date</p>											
<p>8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire - n° d'inscription)</p> <p>Mandataire : Chantal PEAUCELLE</p> <p>n° 92-1189</p> <p><i>[Signature]</i></p>		<p>SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION</p> <p>SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI</p> <p><i>[Signature]</i></p>									

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

9800927

TITRE DE L'INVENTION : Nouveaux polypeptides associés à des récepteurs activateurs
et leurs applications biologiques

LE(S) SOUSSIGNÉ(S) Madame PEAUCELLE Chantal

DÉSIGNÉ(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S)

1) VIVIER Eric
23 Bd Jean Jaurès
13260 CASSIS
FRANCE

2) MORETTA Alessandro
Via Nizza 18/8
16136 GENOVA
ITALIE

3) OLCESE Lucia
Via Palestro 23/7A
16122 GENOVA
ITALIE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance)
lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Le 10 Mars 1998

N°92-1189

Howe

NOUVEAUX POLYPEPTIDES ASSOCIES A DES RECEPTEURS ACTIVATEURS ET LEURS APPLICATIONS BIOLOGIQUES

L'invention porte sur de nouveaux polypeptides particuliers capables de
5 transduire un signal provenant d'un récepteur activateur pour des molécules du
CMH de classe I, fonctionnant en tant que récepteur autonome ou en tant que
co-récepteur, et d'un KAR (*Killer-cell Activatory Receptor*) en particulier, sur
les anticorps obtenus à partir desdits polypeptides servant d'immunogènes, et
sur les acides nucléiques correspondant auxdits polypeptides.

10 L'invention porte également sur les procédés d'obtention de tels
polypeptides et sur les applications biologiques, plus particulièrement,
préventives, thérapeutiques et diagnostiques, desdits polypeptides, anticorps et
acides nucléiques.

15 Pour maintenir la cohérence et assurer l'intégrité de l'organisme, le
système immunitaire doit mettre en jeu un système coordonné de
communications intercellulaires.

Différents types de récepteurs interviennent dans ces communications.
Trois d'entre eux, à savoir les récepteurs pour l'antigène des lymphocytes B
20 (BCR), les récepteurs pour l'antigène des lymphocytes T (TCR) et les
récepteurs reconnaissant la portion Fc des anticorps (RFc), sont maintenant bien
décrits et leurs différentes structures relativement bien connues.

D'autres récepteurs qui ne sont ni récepteurs pour antigènes, ni récepteurs
pour anticorps ont été décrits mais leurs structures et mécanismes d'action sont
25 encore mal connus.

Il s'agit de récepteurs pour des molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) tels que les KARs (*Killer cell Activatory Receptors*) et leur contrepartie inhibitrice, les KIRs (*Killer cell Inhibitory Receptors*).

KARs et KIRs ne sont pas limités aux cellules NK : ils sont également
5 naturellement exprimés par des cellules T.

Les KARs sont hautement homologues aux KIRs (jusqu'à 96% d'homologie entre KARs et KIRs au niveau extracytoplasmique).

KARs et KIRs n'assurent cependant pas les mêmes fonctions : les KIRs sont impliqués dans le contrôle négatif (inhibiteur) de l'activation des cellules
10 NK et T, alors que les KARs sont impliqués dans le contrôle positif (stimulateur) de l'activation des cellules NK et T.

Des différences majeures au niveau des domaines trans- et intracytoplasmiques ont pu être mises en évidence entre isoforme activatrice (KAR) et isoforme inhibitrice (KIR).

15 En effet, contrairement aux KIRs, les KARs expriment un résidu acide aminé chargé (lysine) dans leur domaine transmembranaire et ne contiennent aucun motif ITIM (motif d'inhibition de récepteur basée sur résidu(s) tyrosine) dans leur domaine intracytoplasmique. Les récepteurs monomériques KARs ne contiennent pour autant pas de motif ITAM (motif d'activation
20 d'immunorécepteur basée sur résidu(s) tyrosine).

La situation observée pour les KARs, récepteurs activateurs pour les molécules du CMH et membres de la IgSF (superfamille des immunoglobulines), à savoir récepteur activateur, contrepartie d'un récepteur inhibiteur à ITIM, ne présentant lui-même ni ITIM, ni ITAM mais présentant
25 un acide aminé chargé (lysine, arginine, acide aspartique, acide glutamique) transmembranaire, peut être observée pour d'autres types de récepteurs. Il en est ainsi des récepteurs activateurs (ou à tout le moins non inhibiteurs) pour les molécules du CMH, tels que NKG2C/D (qui est du type lectine et dont la

contrepartie inhibitrice est NKG2A/B), mais aussi pour d'autres récepteurs non inhibiteurs, tels que SIRP β et ILT 1, dont les ligands sont encore inconnus et qui ont été décrits notamment sur des cellules non-hématopoïétiques.

Les KARs peuvent fonctionner en tant que récepteurs autonomes pour les
 5 molécules du CMH de classe I. On sait ainsi que l'engagement des KARs avec des molécules du CMH de classe I exprimées sur la surface de cellules cibles, initie les programmes d'activation lymphocytaires tel qu'il a été établi du fait de la mobilisation du Ca^{2+} intracytoplasmique et de l'induction de la lyse des cellules cibles.

10 Outre leurs fonctions de récepteurs autonomes pour des molécules du CMH, les KARs peuvent également assurer des fonctions co-réceptrices pour des récepteurs TCR et RFc (Mandelboim O. *et al.*, 1996, *Science* 274:2097 ; Cambiaggi A. *et al.*, 1996, *Blood* 87:2369).

En effet, lors de la reconnaissance de fragments constants (Fc)
 15 d'immunoglobulines G (IgG) par des récepteurs tels que CD16 (RFc γ III), et lors de la reconnaissance d'antigènes par le complexe CD3/TCR restreint par des molécules du CMH de classe I ou II, les KARs peuvent jouer le rôle de co-récepteurs et ainsi augmenter l'intensité de la réponse cellulaire, en particulier face à de petites quantités d'antigènes, maintenir la réponse cellulaire dans le
 20 temps, et également coopérer à la stimulation de la prolifération cellulaire.

Les KARs participent donc à la régulation du système immunitaire non seulement en "auto-réaction" face à des protéines endogènes, c'est-à-dire synthétisées par la cellule présentatrice (telles que protéines issues d'agents pathogènes, virus, bactéries, parasites mais se multipliant à l'intérieur de
 25 cellules-hôtes) mais également en "allo-réaction" face à des protéines exogènes et face à des anticorps libérés dans l'organisme.

Le rôle des KARs, naturellement exprimés sur des sous-populations lymphocytaires NK et T, n'est donc pas restreint par leurs ligands propres, à savoir les molécules du CMH de classe I, mais s'étend à l'équilibre du système immunitaire de manière générale.

5 Le fonctionnement des KARs naturellement exprimés influe ainsi sur la prolifération de cellules NK et T, la production par de telles cellules de substances de type cytokines, la lyse de cellules cibles telles que cellules autologues délétères, malignes ou infectées par des virus, cellules allogéniques, mais aussi sur la tolérance du système immunitaire face à certains antigènes.

10 Tout non- ou dys-fonctionnement des KARs peut donc conduire à différentes pathologies ou réactions indésirées, toutes liées au fonctionnement du système immunitaire, telles que maladies d'immuno-déficience, maladies auto-immunes (*e.g.* sclérose en plaque), tumeurs, infections virales, bactériennes, parasitaires, allergies, rejets de greffe. Il a, par exemple, été
15 montré que si l'homme ne présente en moyenne que moins de 10% de lymphocytes exprimant des KARs, la quasi-totalité des lymphocytes de patients atteints de LDGL (maladie lymphoproliférative des lymphocytes granulaires) exprime des KARs.

Des moyens permettant de diagnostiquer un fonctionnement anormal ou
20 non désiré de récepteurs activateurs pour des molécules du CMH de classe I tels que les KARs et d'en contrôler le fonctionnement ont déjà été décrits par les inventeurs dans la demande FR97/05411 du 30 avril 1997.

La demande FR97/05411 avait pour objet de nouveaux polypeptides qui sont nécessaires à la transduction d'un signal provenant d'un KAR, ainsi que les
25 anticorps et acides nucléiques obtenus à partir desdits nouveaux polypeptides selon la demande FR97/05411.

La demande avait également pour objet un procédé d'obtention desdits nouveaux polypeptides ainsi que leurs applications biologiques.

Les polypeptides selon la demande FR97/05411 sont caractérisés en ce qu'ils sont tels qu'obtenus :

i. par immunoprécipitation d'une ou plusieurs fraction(s) polypeptidique(s) de lysats de cellules NK et/ou T à l'aide d'un ou plusieurs anticorps anti-KIR et/ou anti-KAR, tel(s) qu'un anticorps anti-CD158, anti-p70/NKB1, anti-pl40, et plus particulièrement l'anticorps monoclonal EB6, GL183 ou PAX250,

ii. chaque fraction polypeptidique pouvant optionnellement être plus avant épuisée par élimination des fractions immunoprécipitées à l'aide d'anticorps anti-CD3 et/ou ~~anti-FCR γ~~ , et/ou être à nouveau précipitée à l'aide d'un ou plusieurs anticorps ~~anti-KIR~~ et/ou anti-KAR tel(s) qu'un anticorps anti-CD158, anti-p70/NKB1, ~~anti-pl40~~, et plus particulièrement l'anticorps monoclonal EB6, GL183 ou ~~PAX~~250,

iii. par résolution ~~des~~ polypeptides de ladite (desdites) fraction(s) polypeptidique(s) selon leur ~~poids~~ moléculaire, et récupération des polypeptides correspondant à un poids moléculaire de 12 ± 1 kDa environ, ou bien

par résolution ~~des~~ polypeptides de ladite (desdites) fraction polypeptidique(s) selon leur ~~poids~~ moléculaire après avoir soumis ladite (lesdites) fraction(s) polypeptidique(s) à un test kinase, et récupération des polypeptides correspondant à un poids moléculaire de 12, 14 et/ou 16 ± 1 kDa environ. Le test kinase peut être réalisée tel que ci-après décrit dans les exemples (cf. matériel et méthodes de l'exemple 1 ci-après).

De tels polypeptides peuvent également être obtenus, après séquençage, par synthèse chimique ou à l'aide des techniques d'ADN recombinant.

Les polypeptides selon la demande FR97/05411 comprennent également les homologues de tels polypeptides, tels qu'obtenus par délétion, insertion, inversion ou substitution conservatrice d'acides aminés, et les fragments de tels

polypeptides, tels qu'obtenus par hydrolyse desdits polypeptides à l'aide de protéases, lesdits homologues ou fragments étant capables de transduire un signal provenant d'un KAR.

Lesdits peptides, ci-après appelés KARAPs (*KAR-Associated Proteins*),
 5 sont nécessaires à la transduction de signaux provenant de récepteurs activateurs, les KARs, qui ne présentent ni ITIM ni ITAM intracytoplasmiques mais qui présentent un résidu acide aminé transmembranaire.

Dans une forme de réalisation selon la demande FR97/05411, lesdits polypeptides se présentent sous la forme de dimères liés par un pont disulfure ;
 10 ils s'associent de manière sélective et non covalente à des KARs qui fonctionnent, soit en tant que récepteurs autonomes pour des molécules du CMH de classe I, soit en tant que co-récepteurs du TCR ou d'un RFc tel que CD16.

Les polypeptides selon la demande FR97/05411 peuvent être
 15 phosphorylés au niveau d'au moins un résidu tyrosine et/ou d'au moins un résidu sérine, ou être non phosphorylés.

Les polypeptides selon la demande FR97/05411 sont capables de se lier à une molécule à domaine SH2 telle que ZAP-70, p72^{syk}, p56^{lck}, p59^{fyn}, p60^{lyn}, Grb-2, pp³⁶⁻³⁸, PLC- α 1, p85 (~~PI-3~~ kinase), Shc, ou à une molécule à domaine
 20 PTB (*PhosphoTyrosine Binding*) telle que Shc. Une telle liaison peut être observée par incubation de polypeptides selon la demande FR97/05411 avec des molécules à domaine SH2 ou PTB et mesure de la résonance de plasmons (Olcese *et al.* 1996, The Journal of Immunology 156:4531-4534).

Selon une disposition avantageuse, les polypeptides selon la demande
 25 FR97/05411 sont modifiés par glycosylation, phosphorylation, sulfonation, biotinylation, acylation, estérification, ou par addition, substitution, suppression d'entités de forme moléculaire proche de celle des groupes phosphate, telles

que le phosphonate, par addition de réactifs de marquage tels que la luciférase, la GFP (*Green Fluorescence Protein*), par addition de cibles de purification telles qu'un ligand d'affinité, par addition d'entités modifiant sa solubilité. De manière particulièrement avantageuse, les polypeptides selon la demande
5 FR97/05411 sont modifiés de manière à être non hydrolysables dans des conditions biologiques.

Selon une autre disposition avantageuse décrite dans la demande FR97/05411, les polypeptides de l'invention, ou leurs fragments ou homologues, sont capables de traverser une membrane cellulaire, c'est-à-dire une bicouche
10 lipidique.

Ladite demande FR97/05411 visait également les anticorps et fragments de tels anticorps, en particulier fragment Fc, Fv, Fab, F(ab)'₂, obtenus par immunogenèse à partir d'un polypeptide selon la demande FR97/05411 ou à partir d'un fragment ou homologue d'un tel polypeptide.

15 De tels anticorps sont obtenus par immunisation d'animaux, tels que lapins et souris, contre des polypeptides selon la demande FR97/05411 tels qu'obtenus par élution de bandes électrophorétiques, par synthèse chimique ou par une technique de protéines de fusion solubles (GST), lesdits polypeptides, fragments ou homologues étant optionnellement couplés à des immunogènes
20 tels que l'ovalbumine.

Des anticorps monoclonaux sont alors produits par fusion hybridomale des cellules spléniques immunes, criblage et purification des surnageants de culture (Köhler et Milstein, 1975, *Nature* 256, 495-497 ; *Antibodies, a laboratory manual*, 1988, Harlow and David Lane, Ed. Cold Spring Harbor
25 laboratory).

A partir de ces anticorps, des dianticorps peuvent être générés selon des procédures standards.

Ladite demande FR97/05411 visait également les acides nucléiques comprenant une séquence correspondant à la lecture en cadre ouvert, selon le code génétique universel et en tenant compte de la dégénérescence dudit code, de la séquence en acides aminés d'un polypeptide selon la demande
5 FR97/05411 et les variants présentant une homologie supérieure ou égale à 60% avec de tels acides nucléiques et étant capables de coder pour une molécule transductrice d'un signal activateur provenant d'un KAR.

Ladite demande FR97/05411 visait également un procédé d'obtention d'un polypeptide selon la demande FR/97/05411 comprenant les étapes :

10 i. d'immunoprécipiter une ou plusieurs fraction(s) polypeptidique(s) de lysats de cellules NK et/ou T à l'aide d'un ou plusieurs anticorps anti-KIR et/ou anti-KAR, tel(s) qu'un anticorps anti-CD158, anti-p70/NKB1, anti-p140, et plus particulièrement l'anticorps monoclonal EB6, GL183 ou PAX250,

15 ii. chaque fraction polypeptidique pouvant optionnellement être plus avant épuisée par élimination des fractions immunoprécipitées à l'aide d'anticorps anti-CD3 et/ou anti-Fc ϵ RI γ , et/ou être à nouveau précipitée à l'aide d'un ou plusieurs anticorps anti-KIR et/ou anti-KAR tel(s) qu'un anticorps anti-CD158, anti-p70/NKB1, anti-p140, et plus particulièrement l'anticorps monoclonal EB6, GL183 ou PAX250,

20 iii. de séparer les polypeptides de ladite (desdites) fraction(s) polypeptidique(s) selon leur poids moléculaire et récupérer les polypeptides correspondant à un poids moléculaire de 12 ± 1 kDa environ, ou bien

de séparer les polypeptides de ladite (desdites) fraction(s) polypeptidique(s) selon leur poids moléculaire après avoir soumis ladite
25 (lesdites) fraction(s) polypeptidique(s) à un test kinase, et récupérer les polypeptides correspondant à un poids moléculaire de 12, 14 et/ou 16 ± 1 kDa environ.

Ladite demande FR97/05411 concernait également une composition pharmaceutique comprenant, en association avec un véhicule pharmaceutiquement inerte, une quantité efficace d'au moins un polypeptide selon la demande FR97/05411 ou de fragments d'un tel polypeptide, d'au moins
5 un anticorps selon la demande FR97/05411 ou de fragments d'un tel anticorps, ou d'au moins un acide nucléique selon la demande FR97/05411 ou de variants d'un tel acide nucléique.

L'utilisation desdits anticorps et acides nucléiques, en tant qu'agents de diagnostic, entrainait également dans le champ de ladite demande FR97/05411.

10 La composition pharmaceutique selon ladite la demande FR97/05411 peut être formulée sous forme solide, liquide ou sous forme d'une suspension, pour une administration orale, parentérale, topique, intravaginale, intrarectale ou pour une inhalation orale et/ou nasale.

Ladite composition pharmaceutique selon la demande FR97/05411 est
15 destinée à moduler l'activité d'un KAR. Pour stimuler l'activité d'un KAR, ladite composition pharmaceutique comprendra des agents facilitant la transduction du signal provenant dudit KAR, tels que, par exemple, polypeptides ou acides nucléiques selon la demande FR97/05411 capables de traverser une bicouche lipidique. Pour inhiber l'activité d'un KAR, ladite composition pharmaceutique
20 comprendra des agents bloquant la transduction des signaux issus dudit KAR tels que, par exemple, des fragments d'anticorps selon la demande FR97/05411 capables de traverser une bicouche lipidique de manière à bloquer les KARAPs cellulaires, ou des polypeptides phosphorylés ou non, modifiés selon la demande FR97/05411, par exemple non hydrolysables dans des conditions
25 biologiques, de manière à bloquer des protéines à domaine SH2 ou PTB ou toute molécule adaptatrice ou effectrice de l'activation dudit KAR.

Pour déterminer au niveau d'une cellule si un signal provenant d'un KAR est ou non transduit, et pour déterminer si un tel signal est stimulé ou inhibé, de nombreux moyens sont à la disposition de l'homme du métier. Des exemples de tels moyens incluent la stimulation dudit KAR par un ligand et la mesure des cytokines secrétées (*cf.* par exemple, Cambiaggi *et al.* 1996, Blood 87:2369), de la prolifération cellulaire (*cf.* par exemple Mandelboim *et al.* 1996, Science 274:2097), de la cytotoxicité (*cf.* par exemple le test de cytotoxicité redirigée ci-après décrit), de la mobilisation du calcium intracytoplasmique (*cf.* par exemple Bléry *et al.*, 1997, J. Biol. Chem. 272, 8989-8996), et/ou de l'induction de phosphoralytion (*cf.* par exemple Vivier *et al.* 1991, J. Immunol. 146:206).

Ladite demande FR97/05411 visait également une méthode de diagnostic *in vitro* d'un fonctionnement anormal ou non désiré d'une cellule comprenant les étapes de :

- mise en contact d'au moins une cellule, ou un extrait de cellule, avec un anticorps selon la demande FR97/05411 ou un fragment d'un tel anticorps, ou avec un acide nucléique selon la demande FR97/05411 ou un variant d'un tel acide nucléique, et de
- révélation du produit de réaction éventuellement formé.

L'étape de mise en contact est réalisée dans des conditions notamment de durée, température, tampon, le cas échéant de réticulation de gel, permettant l'établissement d'une réaction de type antigène-anticorps par exemple par ELISA (*Enzyme Linked Immunoabsorbant Assays*), ou le cas échéant, d'une réaction de type hybridation d'acides nucléiques et PCR (amplification en chaîne par polymérase).

Pour la révélation du produit de réaction éventuellement formé, peuvent être utilisés des marqueurs tels que marqueurs fluorescents, enzymatiques, radioactifs ou luminescents.

Ladite méthode de diagnostic *in vitro* selon la demande FR97/05411 permet le diagnostic de fonctionnements cellulaires anormaux ou non désirés pouvant se traduire par une maladie immunoproliférative, une maladie d'immunodéficience telle qu'une maladie à VIH, un cancer tel que la maladie lymphoproliférative des lymphocytes granulaires, une maladie auto-immune telle que la polyarthrite rhumatoïde, une maladie infectieuse telle que le paludisme, une réponse allergique, un rejet de greffe.

Ladite demande FR97/05411 se rapportait également à une méthode d'identification de molécules adaptatrices ou effectrices de l'activation d'un KAR et une méthode d'identification de molécules capables de moduler une activité cellulaire résultant de l'activation d'un KAR.

Ladite méthode d'identification de molécules adaptatrices ou effectrices de l'activation d'un KAR selon la demande FR97/05411 comprend les étapes de :

- i. mise en contact des molécules candidates avec des polypeptides selon la demande FR97/05411 (ou avec des fragments de tels polypeptides), et de
- ii. sélection de celles des molécules candidates pour lesquelles une liaison auxdits polypeptides (ou auxdits fragments de polypeptides) est observée.

Les molécules candidates susceptibles d'être des molécules adaptatrices ou effectrices de l'activation d'un KAR peuvent être par exemple choisies parmi les molécules à domaine SH2 ou PTB. Elles peuvent se présenter sous forme recombinante soluble.

L'étape de mise en contact peut être, par exemple, réalisée par couplage des molécules candidates, obtenues sous forme recombinante soluble, susceptibles d'être des molécules adaptatrices ou effectrices de l'activation d'un KAR, à des billes permettant la mesure de la radioactivité telles que billes de liquide scintillant, et par passage, sur lesdites billes, de polypeptides selon la

demande FR97/05411 (ou de fragments de tels polypeptides) sous forme tritiée. Sont alors sélectionnées celles des molécules candidates pour lesquelles une liaison auxdits polypeptides ou fragments de polypeptides est observée par mesure de la radioactivité (cpm).

5 L'étape de mise en contact peut également être réalisée par immobilisation de polypeptides selon la demande FR97/05411 (ou de fragments de tels polypeptides) sur des microsupports permettant la mesure de la résonance de plasmons tel que des microsupports BLAcore (Pharmacia) (cf. par exemple Olcese *et al.*, 1996, The Journal of Immunology 156:4531-4534 ; Vély
10 *et al.*, Immunology Letters 1996, vol.54. p145-150), et par passage, sur lesdits microsupports, de molécules candidates susceptibles d'être des molécules adaptatrices ou effectrices de l'activation d'un KAR. Sont alors sélectionnées celles des molécules candidates pour lesquelles une liaison auxdits polypeptides ou fragments de polypeptides est observée par mesure de la résonance de
15 plasmons (Resonance Unit).

Cette méthode d'identification des molécules adaptatrices ou effectrices de l'activation d'un KAR, quel qu'en soit son mode de réalisation, peut également servir de référentiel dans la mise en oeuvre de la méthode d'identification de molécules capables de moduler une activité cellulaire
20 résultant de l'activation d'un KAR selon la demande FR97/05411.

Cette méthode d'identification de molécules capables de moduler une activité cellulaire résultant de l'activation d'un KAR, selon la demande FR97/05411, comprend les étapes de :

i. mise en contact des molécules candidates avec des molécules
25 adaptatrices ou effectrices de l'activation d'un KAR telles qu'obtenues par la méthode selon la demande FR97/05411 ci-avant décrite et avec des polypeptides selon la demande FR97/05411 (ou avec des fragments de tels polypeptides), et de

ii. sélection de celles des molécules candidates qui exercent un effet sur la liaison entre lesdits polypeptides (ou lesdits fragments de polypeptides) et lesdites molécules adaptatrices ou effectrices, telle qu'observée en l'absence desdites molécules candidates.

5 Les molécules candidates susceptibles de moduler une activité cellulaire résultant d'un KAR peuvent être choisies parmi des banques de composés naturels ou synthétiques, en particulier parmi des banques chimiques ou combinatoires. Lesdites molécules candidates peuvent être de nature protéique, par exemple, (dérivés ou fragments d'anticorps anti-idiotypes tels que les
10 anticorps selon la demande FR97/05411, dérivés ou fragments d'anticorps catalytiques), de nature carbonée, lipidique ou nucléique.

L'étape de mise en contact de la méthode d'identification de molécules capables de moduler une activité cellulaire résultant de l'activation d'un KAR, selon la demande FR97/05411, peut être, par exemple, réalisée par incubation
15 desdites molécules candidates avec des polypeptides selon la demande FR97/05411 (ou de fragments de tels polypeptides) et avec des molécules adaptatrices ou effectrices de l'activation d'un KAR, telles qu'obtenues par la méthode selon la demande FR97/05411, dans des conditions permettant une mesure du taux de liaison entre lesdits polypeptides et lesdites molécules
20 adaptatrices ou effectrices de l'activation d'un KAR, par exemple, en se basant sur une propriété chimique desdites molécules adaptatrices ou effectrices à l'état non lié, telle que propriété enzymatique, propriété de phosphorylation ou d'auto-phosphorylation.

L'étape de mise en contact de la méthode d'identification de molécules
25 capables de moduler une activité cellulaire résultant de l'activation d'un KAR, selon la demande FR97/05411, peut également être réalisée par mise en oeuvre de techniques du type billes de liquide scintillant et polypeptides tritiés ou du

type microsupport et mesure de la résonance de plasmons, telles que ci-avant décrites, en mesurant la radioactivité ou, respectivement, la résonance de plasmons, résultant de la liaison entre lesdits polypeptides et lesdites molécules adaptatrices ou effectrices, en l'absence et en présence des molécules candidates. Sont alors sélectionnées celles des molécules candidates qui soit
5 augmentent soit diminuent de manière statistiquement significative le taux de liaison témoin mesuré entre lesdits polypeptides et lesdites molécules adaptatrices ou effectrices en l'absence desdites molécules candidates.

Les molécules capables de moduler l'activation d'un KAR, telles
10 qu'identifiées par la méthode selon la demande FR97/05411, peuvent être modifiées chimiquement de manière à les rendre non hydrolysables dans des conditions biologiques et/ou de manière à ce qu'elles puissent traverser une bicouche lipidique cellulaire.

Les molécules capables de moduler l'activation d'un KAR, selon la
15 demande FR97/05411, avantageusement agissent en modifiant l'interaction entre lesdits KARAPs et leurs effecteurs ou adaptateurs cellulaires.

Lesdites molécules capables de moduler une activité cellulaire résultant de l'activation d'un KAR, selon la demande FR97/05411, peuvent alors être appliquées à une cellule cultivée *in vitro*, telle que cellule lymphocytaire, dont
20 l'activité KAR a été stimulée, par exemple, par mise en contact avec un ligand. Cette application se fait par pénétration à l'intérieur de ladite cellule, par exemple, par électroporation ou par modification chimique permettant le franchissement d'une bicouche lipidique.

25 Par "récepteur KAR", nous entendons les récepteurs humains de type immunoglobuline contreparties non inhibitrices des récepteurs KIR, tels que les récepteurs KAR p50, mais également tout récepteur de structure similaire à ces récepteurs KAR, et notamment les récepteurs humains de type lectine tels que

NKG2C, NKG2D (naturellement exprimés sur des cellules NK et T), les récepteurs murins de type immunoglobuline tels que pir A (naturellement exprimés sur des cellules myéloïdes, des cellules B), gp49A (naturellement exprimés sur des mastocytes), les récepteurs murins de type lectine tels que
 5 Ly49D, Ly49H (naturellement exprimés sur des cellules NK et T).

Nous entendons donc par polypeptide KARAP tout polypeptide qui est naturellement associé à un récepteur KAR tel que ci-dessus défini et en l'absence duquel ledit récepteur KAR est naturellement incapable de transduire un signal activateur détectable. Ceci n'exclut pas le fait qu'un polypeptide
 10 KARAP déterminé puisse non seulement s'associer à un récepteur KAR tel que ci-dessus défini mais également à d'autres récepteurs monomériques activateurs ou non inhibiteurs de structure proche de celle des KAR tels que ci-dessus défini, et notamment à un récepteur activateur humain de type immunoglobuline de la famille LIR/MIR/ILT tel que ILT1.

15 Nous entendons donc par polypeptide KARAP un polypeptide tel qu'obtenu :

i. par immunoprécipitation d'une ou plusieurs fraction(s) polypeptidique(s) de lysats de cellules KAR⁺ (cellules NK et/ou cellules T et/ou cellules myéloïdes et/ou cellules B et/ou mastocytes) à l'aide d'un ou plusieurs
 20 anticorps anti-KIR et/ou anti-KAR, tel(s) qu'un anticorps anti-CD158, anti-p70/NKB1, anti-p140, et plus particulièrement l'anticorps monoclonal EB6, GL183 ou PAX250,

ii. chaque fraction polypeptidique pouvant optionnellement être plus avant épuisée par élimination des fractions immunoprécipitées à l'aide
 25 d'anticorps anti-CD3 et/ou anti-FcεRIγ, et/ou être à nouveau précipitée à l'aide d'un ou plusieurs anticorps anti-KIR et/ou anti-KAR tel(s) qu'un anticorps anti-

CD158, anti-p70/NKB1, anti-p140, et plus particulièrement l'anticorps monoclonal EB6, GL183 ou PAX250,

iii. par résolution des polypeptides de ladite (desdites) fraction(s) polypeptidique(s) selon leur poids moléculaire, et récupération des polypeptides
5 correspondant à un poids moléculaire de 12 ± 1 kDa environ, ou bien

par résolution des polypeptides de ladite (desdites) fraction polypeptidique(s) selon leur poids moléculaire après avoir soumis ladite (lesdites) fraction(s) polypeptidique(s) à un test kinase, et récupération des polypeptides correspondant à un poids moléculaire de 12, 14 et/ou 16 ± 1 kDa
10 environ. Le test kinase peut être réalisée tel que ci-après décrit dans les exemples (cf. matériel et méthodes de l'exemple 1 ci-après).

La présente invention vise de nouveaux moyens particuliers permettant de diagnostiquer un fonctionnement anormal ou non désiré de récepteurs
15 activateurs pour des molécules du CMH de classe I tels que les KARs et d'en contrôler le fonctionnement.

La présente invention a notamment pour objet des polypeptides KARAP particuliers.

La présente demande a également pour objet un procédé d'obtention desdits
20 nouveaux polypeptides KARAP particuliers ainsi que leurs applications biologiques.

Les nouveaux polypeptides KARAP particuliers selon la présente invention sont caractérisés en ce que leur séquence en acides aminés :

- présente au moins un acide aminé tyrosine phosphorylable,
- 25 - présente une masse moléculaire comprise entre 10 ± 1 et 16 ± 1 kDa environ (masse moléculaire réelle de 10 ± 2 kDa, masse moléculaire apparente sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes de 12 ± 2 à 16 ± 2 kDa selon le degré de phosphorylation),

- comporte une région extracytoplasmique, une région transmembranaire, et une région intracytoplasmique,

- comporte au moins un acide aminé cystéine dans sa région extracytoplasmique,

5 - comporte au moins un acide aminé chargé (R, K, D, K) dans sa région transmembranaire, et

- comporte au moins un motif ITAM YxxL/Ix₆₋₈YxxL/I dans sa région intracytoplasmique.

10 Les nouveaux polypeptides KARAP particuliers selon l'invention comprennent également les homologues de tels polypeptides, tels qu'obtenus par délétion, insertion, inversion ou substitution conservatrice d'acides aminés, et les fragments de tels polypeptides, tels qu'obtenus par hydrolyse desdits polypeptides à l'aide de protéases, lesdits homologues ou fragments étant capables de transduire un signal provenant d'un KAR. En particulier, la présente

15 invention vise également les polypeptides dont la séquence est essentiellement constituée par la partie extracytoplasmique, intracytoplasmique, ou transmembranaire desdits nouveaux polypeptides KARAP particuliers.

Les nouveaux polypeptides ~~KARAP~~ particuliers selon l'invention répondent par ailleurs aux différentes caractéristiques et propriétés des polypeptides KARAP

20 en général, telles qu'elles ont été décrites dans ladite demande FR97/05411 et ci-avant rappelées.

Un nouveau polypeptide KARAP particulier selon l'invention présente une séquence en acides aminés essentiellement constituée par la SEQ ID n°2. La présente invention vise également les polypeptides dont la séquence est

25 essentiellement constituée par la partie extracytoplasmique de la SEQ ID n°2, à savoir la SEQ ID n°3, ou par la partie transmembranaire de la SEQ ID n°2, à

savoir la SEQ ID n°4, ou la partie intracytoplasmique de la SEQ ID n°2, à savoir la SEQ ID n°5.

La présente demande a également pour objet les anticorps et fragments de tels anticorps, en particulier fragment Fc, Fv, Fab, F(ab)'₂, obtenus par immunogénèse à partir d'un nouveau polypeptide KARAP selon la présente invention, ou à partir d'un polypeptide dont la séquence est essentiellement constituée par la partie extracytoplasmique, intracytoplasmique, ou transmembranaire d'un tel polypeptide KARAP particulier. La présente demande vise notamment de tels anticorps dirigés contre la SEQ ID n°2, la SEQ ID n°3, la SEQ ID n°4 ou la SEQ ID n°5, ainsi que leurs fragments.

La présente demande a également pour objet les acides nucléiques comprenant une séquence correspondant à la lecture en cadre ouvert, selon le code génétique universel et en tenant compte de la dégénérescence dudit code, de la séquence en acides aminés d'un polypeptide KARAP particulier selon la présente demande et les variants présentant une homologie supérieure ou égale à 60% avec de tels acides nucléiques et étant capables de coder pour une molécule transductrice d'un signal activateur provenant d'un KAR tel que ci-avant défini. Elle vise notamment tout acide nucléique dont la séquence ADN est essentiellement constituée par la SEQ ID n°1 (ADNc de la protéine KARAP mature de séquence SEQ ID n°2), ou ses parties correspondant aux régions extra-, intra-cytoplasmique et transmembranaire.

La présente demande concerne également une composition pharmaceutique comprenant, en association avec un véhicule pharmaceutiquement inerte, une quantité efficace d'au moins un nouveau polypeptide KARAP particulier selon l'invention ou de fragments d'un tel polypeptide, d'au moins un anticorps selon l'invention ou de fragments d'un tel anticorps, ou d'au moins un acide nucléique selon l'invention ou de variants d'un tel acide nucléique.

L'utilisation desdits anticorps et acides nucléiques, en tant qu'agents de diagnostic, entre également dans le champ de la présente demande.

La présente demande vise également une méthode de diagnostic *in vitro* d'un fonctionnement anormal ou non désiré d'une cellule comprenant les étapes de :

- 5 - mise en contact d'au moins une cellule, ou un extrait de cellule, avec un anticorps selon l'invention ou un fragment d'un tel anticorps, ou avec un acide nucléique selon l'invention ou un variant d'un tel acide nucléique, et de
- révélation du produit de réaction éventuellement formé.

10 Les étapes de mise en contact et révélation peuvent être réalisées telles que décrites dans ladite demande FR97/05411 et ci-avant rappelées.

 Ladite méthode de diagnostic *in vitro* selon la présente demande demande permet le diagnostic de fonctionnements cellulaires anormaux ou non désirés pouvant se traduire par une maladie immunoproliférative, une maladie d'immunodéficience telle qu'une maladie à VIH, un cancer tel que la maladie
15 lymphoproliférative des lymphocytes granulaires, une maladie auto-immune telle que la polyarthrite rhumatoïde, une maladie infectieuse telle que le paludisme, une réponse allergique, un rejet de greffe.

 La présente demande se rapporte également à une méthode d'identification de molécules adaptatrices ou effectrices de l'activation d'un KAR
20 et une méthode d'identification de molécules capables de moduler une activité cellulaire résultant de l'activation d'un KAR. Ces méthodes répondent aux caractéristiques et propriétés décrites pour les polypeptides KARAP en général dans ladite demande FR97/05411 et ci-dessus rappelées, tout en mettant en oeuvre les polypeptides KARAP particuliers selon la présente invention en lieu
25 et place desdits polypeptides KARAP en général.

La présente demande a également pour objet une méthode pour obtenir la séquence de polypeptides KARAP particuliers selon l'invention. Cette méthode, dont un exemple de réalisation est décrite dans l'exemple 2 ci-après (stratégies bio-informatiques), comprend notamment le criblage de celles des séquences polypeptidiques qui répondent aux critères suivants :

- la séquence présente au moins un acide aminé tyrosine phosphorylable,
- la séquence présente une masse moléculaire comprise entre 5 et 25 kDa environ,
- la séquence comporte une région extracytoplasmique, une région transmembranaire, et une région intracytoplasmique,
- la séquence comporte au moins un acide aminé cystéine dans sa région extracytoplasmique,
- la séquence comporte au moins un acide aminé chargé (R, K, D, K) dans sa région transmembranaire, et
- la séquence comporte au moins un motif ITAM YxxL/Ix₆₋₈YxxL/I dans sa région intracytoplasmique.

La présente demande a également pour objet une méthode pour déterminer ou contrôler si un polypeptide candidat, de séquence connue, correspond à un polypeptide KARAP. Un exemple de réalisation d'une telle méthode est présenté dans l'exemple 2 ci-après. Une telle méthode consiste à produire un anticorps contre une partie caractéristique de ce polypeptide candidat (par exemple une région intracytoplasmique comprenant au moins un motif ITAM ou une région extracytoplasmique), et à vérifier que cet anticorps reconnaît, sur une cellule fonctionnelle (une cellule KAR⁺ fonctionnelle par exemple) une cible qui se trouve associée au récepteur pour lequel le polypeptide candidat est supposé être le KARAP (c'est-à-dire, dans le cas de

cellules KAR⁺, à vérifier que l'anticorps reconnaît une cible qui se trouve associée à un récepteur KAR).

Cette méthode, selon l'invention, d'identification de polypeptides KARAP consiste ainsi notamment à :

5 - produire un anticorps mono- ou polyclonal dirigé contre ce polypeptide candidat, et en particulier contre une région de ce polypeptide candidat qui comprend au moins un motif ITAM (par exemple, dans le cas de la protéine KARAP murine identifiée ci-dessus, un anticorps dirigé contre une région de la partie extracytoplasmique (SEQ ID n°3) ou de la partie intracytoplasmique (SEQ ID n°5) de la SEQ ID n°2),

10 - mettre en contact cet anticorps avec un lysat de cellules, possédant, sous une forme fonctionnelle, le récepteur activateur ou non inhibiteur pour lequel le polypeptide candidat est supposé constituer le KARAP, par exemple des cellules KAR⁺ fonctionnelles telles que des cellules NK ou T, dans des conditions douces permettant des réactions de liaison de type antigène-anticorps,

20 - identifier le polypeptide candidat comme étant un polypeptide KARAP selon l'invention lorsque dans les produits de réaction éventuellement formés se trouvent un produit de masse moléculaire apparente proche de celle d'un KAR (environ 50 kDa) et un produit de masse moléculaire apparente proche de celle du polypeptide candidat notamment entre 10 et 16 kDa environ).

Cette méthode d'identification selon l'invention peut notamment être réalisée :

25 - en mettant en contact ledit anticorps comme ci-dessus décrit,

 - faire précipiter les produits de réaction éventuellement formés dans des conditions douces de détergent préservant les complexes moléculaires (par exemple digitonine à 1%, voir exemple 1 ci-dessus),

- mesurer la masse moléculaire des produits précipités, par exemple par migration électrophorétique en présence des marqueurs de masse moléculaire sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, et

- en identifiant le polypeptide candidat comme étant un polypeptide KARAP selon l'invention comme ci-dessus décrit.

La présente invention est illustrée par les exemples suivants qui ne doivent être en aucun cas considérés comme limitatifs.

Il y est fait référence aux neuf figures suivantes:

- la Figure 1 présente

en A, une analyse par cytomètre de flux (FACScan, marque déposée Becton-Dickinson) en immunofluorescence indirecte de cellules cultivées sur IL-2 (interleukine 2) et issues de patients atteints de LDGL (maladie lymphoprolifératrice des lymphocytes granulaires) désignés par R.P., D.F. et MAL., et

en B, les résultats d'un test de cytotoxicité re-dirigé avec différents anticorps monoclonaux, réalisé sur des cellules NK cultivées sur IL-2 provenant de différents donneurs ;

- la Figure 2 présente :

en A, une analyse SDS-PAGE (résolution de protéines par électrophorèse sur gel et dodécylsulfate de sodium) réalisée à partir de cellules NK de donneur R.P. (p50.1⁺) radiomarquées au ¹²⁵I et immunoprécipitées à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-CD158 EB6, avant et après épuisement en FcεRIγ et en CD3ζ à l'aide d'anticorps anti-CD3ζ / anti-FcεRIγ,

en B, une analyse SDS-PAGE avec une sonde anticorps anti-CD3ζ de lysats complets de cellules D.F. ou d'immunoprécipités de tels lysats ;

- la Figure 3 présente :

en A, une analyse SDS-PAGE des protéines phosphorylées issues de tests kinase *in vitro* auxquels ont été soumis des immunoprécipités de lysats de cellules NK MAL.,

5 en B, le même type d'analyse SDS-PAGE qu'en figure 3A mais réalisée à partir de cellules RBL-2H3 p50.2⁺,

en C, une analyse par électrophorèse sur couche mince (TLE) des acides aminés phosphorylés des bandes KARAPs et CD3 ζ excisées après tests kinase *in vitro* réalisés sur des immunoprécipités anti-CD158 et anti-CD16, respectivement, de cellules NK R.P.,

10 - la Figure 4 présente une analyse SDS-PAGE bidimensionnelle en conditions non-dénaturantes/dénaturantes d'immunoprécipités anti-CD158 de lysats de cellules NK R.P. ayant subi un test kinase, et

- la Figure 5 présente les récepteurs activateurs ou non-inhibiteurs de la superfamille des immunoglobulines (IgSF) ou du type lectine, et leurs contreparties inhibitrices,

15 - la Figure 6 représente la structure schématique de récepteurs KIR (p58) et KAR (p50),

- la Figure 7 représente la séquence ADNc d'un polypeptide KARAP selon l'invention (SEQ ID n°1),

20 - la Figure 8 représente la séquence nucléotidique (comprise entre la séquence leader exclue et le codon stop) et la séquence en acides aminés d'un polypeptide KARAP selon l'invention (protéine mature, SEQ ID n°2), et

- la Figure 9 représente l'alignement des ITAMs humains et de l'ITAM d'un polypeptide KARAP selon l'invention.

25

EXEMPLE 1 :

1. Matériels et méthodes

5 Anticorps monoclonaux (mAbs) et réactifs

Les anticorps monoclonaux suivants ont été utilisés :

- des anticorps anti-CD3, anti-CD16 et anti-CD56 d'isotype IgG1 tels que JT3A (Coulter Immunotech référence 0178), KD1 (Coulter Immunotech
10 référence 0813) et TA181.H12 (Coulter Immunotech référence 1844), respectivement,
- des anticorps anti- CD3 ζ tels que TIA-2 (Coulter Immunotech 66045P2),
- des anticorps anti-CD158, à savoir des anticorps anti-p58.1 tels' que
15 EB6 (Coulter Immunotech référence 1847), des anticorps anti-p58.2 tels que GL183 (Coulter Immunotech référence 1846) et des anticorps anti-p50.3 tels que PAX250 décrit dans Bottino *et al.* (*Eur. J. Immunol.* 1996, 26, 1816),
- un antisérum de lapin anti-Fc ϵ RI γ tel que l'antisérum 666 décrit dans Jouvin M.H. *et al.*, 1994, *J. Biol. Chem.* 269, 5918-5925,
- 20 - un antisérum de lapin anti-Fc ϵ RI α tel que l'antisérum BC4 décrit dans Bociano L.K. *et al.*, 1986, *J. Biol. Biochem.* 261, 11823-11831,
- un antisérum de chèvre anti-souris conjugué à la peroxydase de raifort (Sigma A-2304) et un antisérum de chèvre anti-lapin conjugué à la peroxydase de raifort (Sigma A-0545),
- 25 - une immunoglobuline de chèvre anti-souris conjuguée à de l'isothiocyanate de fluoresceine (Coulter-Immunotech 0819 F(ab')₂),

- des anticorps monoclonaux GL183-Phycoérythrine (GL183-PE) (Coulter-Immunotech 2278), (EB6-Phycoérythrine (EB6-PE) (Coulter-Immunotech 2277) et une immunoglobuline de chèvre anti-souris-phycoérythrine (anti-souris-PE) (Coulter Immunotech 0855 F(ab')₂).

5 Le tampon de lyse contenait du Tris-HCl 25 mM pH 7,5 ; NaCl 150 mM ; digitonine 1% ; orthovanadate de sodium 100 µM ; NaF 10 mM ; aprotinine 2 µg/ml ; leupeptine 2 µg/ml ; tous ces produits ayant été achetés auprès de Sigma (St Louis, MO, USA).

10 Le tampon kinase contenait de l'Hepes 20mM pH 7,2 ; NaCl 100 mM ; MnCl₂ 5 mM ; MgCl₂ 5mM ; ³²γ ATP 10 µCi = 370 kBq (Amersham, Buckinghamshire, UK).

Le tampon d'électrophorèse sur couche mince (TLE) contenait de l'acide acétique glacial à 10% et de la pyridine à 1% dans de l'eau ; pH 3,5.

15 Cellules

Cellules NK humaines issues de patients LDGL ou cellules LDGL :

20 Les cellules NK humaines ont été obtenues à partir de patients atteints de maladie lymphoproliférative des lymphocytes granulaires (LDGL, *Lymphoproliferative Disease of Granular Lymphocytes*) de la lignée des cellules NK CD56⁺, CD16⁺, CD3⁻. Des lymphocytes de sang périphérique (PBL, *Peripheral Blood Lymphocyte*) ont été isolés à partir d'échantillons de sang de patients atteints de LDGL par centrifugation selon un gradient
25 Ficoll/Hypaque. Ces cellules LDGL ont été alors cultivées à 37°C à une concentration de 10⁶ cellules par ml sur milieu RPMI-1640, à 10 µg/ml de

pénicilline-streptomycine et 10 % de sérum de veau foetal, en présence de cellules nourricières irradiées allogéniques et de 100 U/ml de rIL-2.

Obtention de cellules transfectées RTIIB.p50.2⁺ :

5

Des transfectants de cellules RBL-2H3 (American Type Culture Collection) exprimant des KARs p50.2 (cellules RTIIB.p50.2⁺) ont été réalisées telles que décrites dans Bléry *et al.* 1997, J. Biol. Chem., 272, 8989-8996). La figure 6, représente de manière schématique, la structure de
10 récepteurs KIR p58 (récepteurs humains inhibiteurs de type immunoglobuline) et des récepteurs KAR p50 (contrepartie non inhibitrice des récepteurs KIR p58).

Brièvement, les cellules RTIIB utilisées sont les cellules classiquement décrites comme étant des cellules RBL-2H3 transfectées de manière à exprimer
15 le récepteur FcγRIIb2 murin et la molécule chimérique CD25/CD3 comprenant les domaines ecto- et trans-membranaires complets de la CD25 humaine liés au domaine intracytoplasmique complet de la CD3 murine.

Ces cellules RTIIB ont été de plus transfectées par électroporation d'ADNc 183.Act2 (codant pour p50.283) porté sur le vecteur d'expression
20 RSV-5gpt.

Des cellules transfectées RTIIB.p50.2⁺ stables ont été établies par culture en présence de xanthine (250 µg/l), d'hypoxanthine (13,6 µg/l) et d'acide mycophénolique (2 µg/l).

25 Test Cytolytique

L'activité cytolytique des cellules LDGL cultivées sur IL-2 a été mesurée par rapport à la lignée cellulaire murine P815 (American Type Culture Collection) en l'absence ou en présence des mAbs anti-CD16, anti-CD158 et anti-CD56.

- 5 Brièvement, 5×10^3 cellules cibles marquées au ^{51}Cr ont été ajoutées à des dilutions en série de cellules effectrices en présence de 50 μl d'anticorps monoclonal surnageant d'hybridome au démarrage du test standard de libération de ^{51}Cr durant 4 heures (Vivier E. *et al.*, 1991, *J. Immunol.* 146:206).

10 Radio-ioduration

- Les cellules ($10 - 50 \times 10^6$) ont été fixées au formaldéhyde à 0,5% dans du PBS (tampon de phosphate de sodium), puis perméabilisées pendant 5 minutes à l'aide de digitonine à 30 $\mu\text{g/ml}$ dans du PBS préalablement à une
15 ioduration catalysée par la lactoperoxidase (^{125}I , NEN-Dupont, Wilmington, DE, USA) tel que décrit par Anderson P. *et al.*, 1989, *J. Immunol.* 143:1899.

- Les cellules ont été lysées pendant 30 minutes à 4°C dans un tampon de lyse à digitonine. Les surnageants post-nucléaires pré-purifiés ont alors été immunoprécipités à l'aide d'anticorps spécifiques couvrant des billes S4B-
20 Sépharose (Pharmacia, Piscataway, NJ, USA) (Vivier E. *et al.*, 1991, *J. Immunol.* 146:206). Les immunoprécipités ont été analysés par SDS-PAGE (résolution de protéines par électrophorèse sur gel et dodécylsulfate de sodium) et autoradiographie.

25 Test kinase *in vitro*

Les cellules (10×10^6 par échantillon) ont été lysées dans 1 ml de tampon de lyse (voir réactifs). Les surnageants post-nucléaires prépurifiés ont été immunoprécipités pendant 2 à 3 heures en utilisant des anticorps monoclonaux liés de manière covalente à une Sépharose 4B activée par CnBr (Pharmacia).

- 5 Les complexes immuns ont été lavés trois fois dans du tampon de lyse ; 40 μ l de tampon kinase (voir réactifs) ont alors été ajoutés aux immunoprécipités pendant 10 minutes à 37°C. La réaction kinase a été arrêtée par addition du tampon réducteur SDS-échantillon. Les échantillons ont été portés à ébullition préalablement à une analyse par SDS-PAGE et autoradiographie. Dans
10 certaines expériences, les échantillons ont été analysés par SDS-PAGE diagonale non-dénaturante/dénaturante bidimensionnelle.

Analyse de la phosphorylation des KARAPs

- 15 Après le test kinase *in vitro* et la séparation par SDS-PAGE, les protéines phosphorylées ont été excisées des gels séchés et ont été éluées en utilisant un Centrilutor (Amicon) ou une solution de SDS (dodécylsulfate de sodium) à 0,1% dans du PBS (tampon de phosphate de sodium). Les protéines éluées ont été précipitées dans de l'acide trichloroacétique à 20% à 4°C pendant 2 heures,
20 préalablement à une incubation dans 200 μ l d'HCl 5,7 M à 110°C pendant 90 minutes. Les acides aminés individuels ont alors été séchés et remis en suspension dans 5 μ l de tampon TLE (voir réactifs) contenant 5 μ g de chaque phosphotyrosine, phosphothréonine, phosphosérine non marquée (Sigma) en tant qu'étalons standards. Les échantillons ont été déposés sur des plaques de
25 cellulose (DC-cellulose 100- μ m) et mis à migrer à 1500 V pendant 45 minutes à 4°C sur un Multiphor II (Pharmacia). Des étalons standards ont été développés à l'aide de ninhydrine à 1% dans de l'acétone et les acides aminés marqués au ^{32}P ont été identifiés par autoradiographie.

Analyse par immunotransfert

Les immunoprécipités ont été résolus par SDS-PAGE, transférés sur
 5 filtres de nitrocellulose et confrontés aux sondes anticorps anti-CD3 ζ ou anti-
 FC ϵ RI γ diluées dans une solution de PBS à 5% en lait déshydraté écrémé. Les
 immunotransferts ont été révélés en utilisant un antisérum de chèvre anti-souris
 ou anti-lapin conjugué à la peroxydase de raifort (Sigma références A-2304 et
 A-0545 respectivement) et le système de détection ECL commercialisé par
 10 Amersham (RPN 2209).

2. Résultats

Phénotype de surface

15

Le phénotype de surface des cellules NK issues de patients LDGL et
 cultivées sur IL-2 (interleukine-2) a été analysé par FACScan (tri de cellules
 activées par fluorescence) en immunofluorescence indirecte.

Sont ci-après reportés les résultats de l'étude relative à trois de ces
 20 patients, ci-après nommés R.P., D.F. et MAL.

Lesdits résultats sont illustrés par la Figure 1A où est présentée une
 analyse par FACScan en immunofluorescence indirecte de cellules LDGL
 (maladie lymphoproliférative des lymphocytes granulaires) R.P., D.F. ou
 MAL. cultivées sur IL-2. Une immunoglobuline de chèvre anti-souris conjuguée
 25 à de l'isothiocyanate de fluoresceine a servi de réactif de seconde étape. Pour
 chaque type de cellules LDGL (cellules LDGL R.P. pour les analyses
 présentées dans la bande horizontale supérieure, cellules LDGL D.F. pour celles

de la bande horizontale médiane, cellules LDGL MAL. pour celles de la bande horizontale inférieure) et pour chaque traitement subi (traitement témoin C pour les graphes présentés à gauche ou traitement par l'anticorps monoclonal indiqué, soit de gauche à droite, anti-CD3, anti-CD16, anti-CD158 EB6, anti-CD158 GL183, anti-CD158 PAX 250), sont reportées, en abscisse, les intensités de fluorescence et, en ordonnées, le nombre relatif de cellules.

On peut observer que :

- les cellules NK R.P., D.F. et MAL. sont toutes CD3⁻ et CD16⁺,
- 10 - les cellules NK R.P. sont p50.1⁺, p50.2⁻, p50.3⁻ : elles sont reconnues par l'anticorps monoclonal ~~anti-CD158~~ EB6 et ne sont pas reconnues par les anticorps monoclonaux anti-~~CD158~~ GL183 et PAX250,
- les cellules NK D.F. sont p50.1⁻, p50.2⁺, p50.3⁻ : elles sont reconnues par l'anticorps monoclonal anti-CD158 GL183 et ne sont pas reconnues par les
- 15 anticorps monoclonaux anti-~~CD158~~ EB6 et PAX250,
- les cellules NK MAL. sont p50.1⁻, p50.2⁻, p50.3⁺ : elles sont reconnues par l'anticorps monoclonal anti-CD158 PAX250 et ne sont pas reconnues par les anticorps monoclonaux ~~anti-CD158~~ EB6 et GL183.

Les trois patients atteints de LDGL ont donc présenté une

20 lymphoprolifération de cellules NK reconnue par des anticorps anti-CD158 : anti-KIR p58.1 (EB6), anti-KIR p58.2 (GL183) et anti-KAR p50.3 (PAX250) respectivement. Trois groupes de cellules NK ont ainsi pu être définis : cellules LDGL R.P., cellules LDGL D.F. et cellules LDGL MAL.

25

Test cytolytique

Des essais de cytotoxicité re-dirigée utilisant P815 en tant que cellules cibles $Fc\gamma R^+$ ont été réalisés pour les cellules NK R.P. $p50.1^+$, D.F. $p50.2^+$ et MAL. $p50.3^+$.

Les résultats sont illustrés par la Figure 1B où est présenté un test de cytotoxicité re-dirigée avec différents anticorps monoclonaux : des cellules NK issues des donneurs indiqués (R.P. $p50.1^+$ à gauche, D.F. $p50.2^+$ au centre, ou MAL. $p50.3^+$ à droite) et cultivées sur IL-2 ont été utilisées comme cellules effectrices. Le test a été réalisé en présence de : aucuns anticorps (cercles blancs), anticorps monoclonal anti-CD16 (triangles noirs), anticorps monoclonal anti-CD56 (triangles blancs), anticorps monoclonal anti-CD158 (EB6 pour R.P., GL183 pour D.F. et PAX250 pour MAL.) (cercles noirs). En abscisse sont reportés les ratios cellules effectrices : cellules cibles (E:T) et, en ordonnées, le pourcentage de lyse spécifique.

Les tests de cytotoxicité re-dirigée indiquent que, par contraste avec ce qui est observé lors d'une stimulation de récepteurs KIRs, l'addition d'anticorps anti-CD158 aux cellules NK augmente considérablement la cytolyse des cellules P815 (Figure 1B).

A titre de témoins, les anticorps monoclonaux anti-CD16 augmentent la cytolyse spontanée des P815 de manière similaire aux anticorps monoclonaux anti-CD158, alors qu'un anticorps monoclonal anti-CD56 apparié à l'isotype n'a aucun effet (Figure 1B).

Ces cellules NK expriment donc à leur surface des KARs, l'isoforme activatrice des KIRs. Ces résultats ont été, de plus, confirmés par analyses PCR (amplification en chaîne par polymérase) avec transcriptase inverse des ADNc KIR/KAR.

Analyse des KARs exprimés par radio-ioduration et immunotransferts :
identification des KARAPs

Les récepteurs KARs exprimés sur les cellules NK issues de patients
 5 LDGL ont été analysés par radio-ioduration interne suivie
 d'immunoprécipitation.

Les résultats sont illustrés par la figure 2A où est présentée une analyse
 SDS-PAGE, sur gel à 13% en conditions dénaturantes, réalisée à partir de
 cellules NK (10×10^6 cellules/piste) de donneur R.P. ($p50.1^+$) radiomarquées au
 10 ^{125}I et immunoprécipitées à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-CD158 EB6
 (piste 1), puis purifiées à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-CD3 ζ /anti-FC ϵ RI γ
 (pistes 2 à 7) et enfin re-immunoprécipitées à l'aide de l'anticorps monoclonal
 anti-CD158 EB6 (piste 8).

Les mêmes profils ont été obtenus avec les donneurs D.F. ($p50.2^+$) et
 15 MAL. ($p50.3^+$) (données non présentées).

On peut observer que les immunoprécipités d'anticorps anti-CD158
 préparés à partir de lysats de cellules NK contiennent, en plus des KARs
 observés à ≈ 50 kDa, une bande de masse moléculaire plus faible migrant à $12 \pm$
 1kDa environ.

20 Il a été montré que les KIRs s'associent avec les polypeptides CD3 ζ et
 FC ϵ RI γ dans les cellules NK humaines. Les expériences de pré-épuisements
 utilisant des anticorps anti-CD3 ζ et anti-FC ϵ RI γ ont éliminé la possibilité que la
 bande de 12 kDa environ associée au KARs soit CD3 ζ ou FC ϵ RI γ (Figure 2A).

L'ensemble protéique correspondant à cette bande à 12 ± 1 kDa environ a
 25 été baptisé KARAPs (*KAR-associated proteins*, protéines associées aux
 KARs).

Ces résultats ont été confirmés par des expériences d'immunotransferts qui ont révélé l'absence de toute bande réactive en présence d'anticorps anti-CD3 ζ dans les immunoprécipités de mAbs anti-CD158 préparés à partir de lysats NK.

5 Ces résultats, obtenus en présence d'anticorps anti-CD3 ζ , sont illustrés par la figure 2B où est présentée une analyse de lysats complets de cellules D.F. ou d'immunoprécipités de tels lysats par résolution SDS-PAGE sur gel à 15% en conditions dénaturantes et incubation des filtres de nitrocellulose avec une sonde anticorps monoclonal anti-CD3 ζ . Les lysats complets de cellules (LCC)
 10 D.F. ont été déposés à 5×10^6 cellules/piste en piste 1, les immunoprécipités de tels lysats à 15×10^6 cellules/piste en pistes 2 à 4. Les immunoprécipitations ont été réalisées sur des lysats de cellules D.F. en utilisant l'anticorps monoclonal anti-Fc ϵ RI α BC4 en témoin piste 2, l'anticorps monoclonal anti-CD16 en piste 3 et l'anticorps monoclonal anti-CD158 GL183 en piste 4.

15 Les mêmes résultats ont été obtenus pour les cellules R.P. et MAL., à l'aide de mAb anti-CD3 ζ .

Les résultats obtenus à l'aide de mAb anti-Fc ϵ RI γ (données non présentées) ont apporté la même confirmation.

20 Analyse des KARAPs par test kinase *in vitro* et électrophorèse sur couche mince (TLE)

Les tests kinase *in vitro* réalisés sur les immunoprécipités d'anticorps monoclonaux anti-CD158 ont révélé que les KARs s'associent à une
 25 phosphoprotéine prédominante de faible poids moléculaire migrant à environ 14 ± 1 kDa dans les cellules NK.

Les résultats sont illustrés par la figure 3A : des lysats préparés à partir de cellules NK MAL. ont été immunoprécipitées avec l'anticorps indiqué (anti-FcεRIα en piste 1, anti-CD16 en piste 2, anti-CD158 en piste 3) préalablement à des tests kinase *in vitro*. Les protéines phosphorylées ont été séparées par SDS-PAGE sur un gel à 15% en conditions dénaturantes.

Ces résultats sont en accord avec le changement de masse moléculaire attendue pour la forme phosphorylée de la KARAP à 12 kDa observée par ioduration interne. De plus, les immunoprécipités de mAbs anti-CD158 préparés à partir de cellules NK KAR⁺ comprennent deux autres phospho-KARAPs, migrant à 16 ± 1 kDa et 12 ± 1 kDa respectivement (Figure 3A).

L'association des KARs avec un groupe similaire de KARAPs phosphorylées a aussi été observée avec un panel de clones de cellules NK KAR⁺ et était absente de clones NK KIR⁺. Il a été observé que l'intensité relative des phospho-KARAPs à 16,14 et 12 kDa peut varier selon l'origine des cellules NK.

Une analyse des acides aminés phosphorylés a révélé que la KARAP majeure à 14 kDa est principalement phosphorylée au niveau des résidus tyrosine.

Les résultats sont illustrés par la figure 3C : les bandes KARAPs (à gauche) et CD3ζ (à droite) ont été excisées après test kinase *in vitro* et soumises à une analyse des acides aminés phosphorylés par électrophorèse sur couche mince. Dans cette expérience, les bandes KARAPs et CD3ζ ont été isolées à partir d'immunoprécipités d'anticorps monoclonaux, respectivement, anti-CD158 et anti-CD16 préparés à partir de lysats de cellules NK. R.P.

Néanmoins, une phosphorylation au niveau de résidus sérine mais non au niveau de résidus thréonine peut aussi être détectée. A titre de témoin, l'analyse

des acides aminés phosphorylés a confirmé la phosphorylation de CD3 ζ au niveau du résidu tyrosine seulement.

KARAPs et transduction du signal activateur (transfectants KAR⁺)

5

Par contraste avec les KIRs p58.2, l'expression de KAR p50.2 dans les transfectants de la lignée cellulaire non lymphoïde RBL-2H3 ne conduit pas à une reconstitution de la fonction activatrice des KARs p50.2. En effet, la stimulation de transfectants de cellules RBL-2H3 p50.2⁺ induite par des anticorps anti-CD158 ne conduit à aucune mobilisation détectable du Ca²⁺ intracytoplasmique, ni à aucune libération détectable de sérotonine.

10

De manière remarquable, les tests kinase *in vitro* réalisés sur les immunoprécipités d'anticorps monoclonaux anti-CD158 préparés à partir de transfectants de cellules RBL-2H3 p50.2⁺ n'ont inclus aucune KARAP détectable.

15

Les résultats sont illustrés par la figure 3B : des lysats préparés à partir de cellules RBL-2H3 p50.2⁺ ont été immunoprécipitées avec l'anticorps indiqué (anti-CD3 ϵ en piste 1, anti-Fc ϵ RI α en piste 2, anti-CD158 en piste 3) préalablement à des tests kinase *in vitro*. Les protéines phosphorylées ont été séparées par SDS-PAGE sur un gel à 15% en conditions dénaturantes.

20

Le défaut d'association des KARs aux KARAPs dans les transfectants de cellules RBL-2H3 p50.2⁺ a été également confirmé par ioduration interne (données non présentées).

25

Les KARAPs s'associent donc de manière sélective aux KARs, et l'absence d'association des KARs aux KARAPs est corrélée avec l'incapacité des KARs à transduire un quelconque signal activateur détectable.

Association KAR-KARAPs (gel diagonal)

5 Finalement, une analyse sur gel bidimensionnel diagonal des immunoprécipités d'anticorps monoclonaux anti-CD158 a révélé que les phospho-KARAPs de 16, 14 et 12 kDa environ décroissent le long du gel diagonal.

10 Les résultats sont illustrés par la figure 4 : des immunoprécipités (IP) d'anticorps monoclonaux anti-CD158 préparés à partir de lysats de cellules NK R.P. ont été soumis à un test kinase *in vitro* préalablement à analyse par SDS-PAGE sur gel à 13% bidimensionnel en conditions non-dénaturantes/(direction horizontale)/dénaturantes (direction verticale).

Ces résultats indiquent ainsi que les KARs sont associés dans les cellules NK à un complexe de dimères KARAPs liés par liaison disulfure.

15 3. Discussion

20 Les KARs, récepteurs activateurs autonomes des molécules du CMH de classe I ou co-récepteurs du TCR (récepteur de lymphocyte T) ou de RFc (récepteur pour fragment constant d'immunoglobuline), représentent une voie nouvelle pour l'activation des cellules NK et T.

Les inventeurs ont démontré que les KARs sont en fait assemblés dans les cellules NK en un complexe multimérique faisant intervenir des KARAPs associées sous forme de dimères liés par liaison disulfure.

25 Si l'analyse par radio-ioduration a mis en évidence une KARAP à environ 12 ± 1 kDa, l'analyse par test kinase a mis en évidence trois phospho-KARAPs à environ 16, 14 et 12 ± 1 kDa.

La corrélation entre l'association des KARs aux KARAPs et la fonction activatrice des KARs suggère que les KARAPs agissent en tant que sous-unités transductrices du complexe KAR multimérique.

Cependant, l'absence d'association des KARs aux KARAPs, telle qu'observée pour les transfectants de cellules RBL-2H3, n'empêche pas l'expression du récepteur sur la surface cellulaire, contrairement à ce qui a été observé pour les récepteurs activateurs multimériques pour antigènes ou anticorps incluant des polypeptides à ITAM (motif d'activation d'immunorécepteurs basée sur résidu(s) tyrosine(s)).

D'autres récepteurs activateurs, ou à tout le moins non inhibiteurs, de la superfamille des immunoglobulines ou présentent de frappantes similarités avec les KARs p50 (KARs humains de type immunoglobuline) : les récepteurs KARs humains de type lectine NKG2C/D, les récepteurs KAR murins de type immunoglobuline p μ A, gp49A, les récepteurs KAR murins de type lectine Ly49D, Ly49H, mais aussi les récepteurs activateurs humains de la famille LIR/MIR/ILT tels que ILT 1.

Ces similarités sont illustrées par la figure 5 où sont présentés les récepteurs activateurs ou non-inhibiteurs de la superfamille des immunoglobulines (IgSF) ou du type lectine, et leurs contreparties inhibitrices. En dessous du nom de chaque couple de récepteurs, sont indiquées les cellules les exprimant naturellement. Les récepteurs activateurs ou non-inhibiteurs ne présentent ni ITIM (motif d'inhibition d'immunorécepteur basée sur résidu(s) tyrosine) ni ITAM (motif d'activation d'immunorécepteur basée sur résidu(s) tyrosine) mais présentent un résidu acide aminé chargé dans leur domaine transmembranaire (TM) (R = arginine, K= lysine, D=acide aspartique, E=acide glutamique). Les contreparties inhibitrices (de gauche à droite, ILT2/ILT1, SIRP α /SIRP β , KIR/KAR, NKG2A/B/NKG2C/D) comportent un motif ITIM

dans leur partie intracytoplasmique (IC). Chaque récepteur activateur, ou ~~non-~~inhibiteur, présente, au niveau extracytoplasmique (EC), une forte ~~homologie~~ avec sa contrepartie inhibitrice.

5 EXEMPLE 2 :

La caractérisation biochimique des molécules KARAPs (cf. exemple 1 ci-dessus) nous a permis de préciser les critères d'identification principaux des polypeptides KARAP, et notamment :

- 10 - polypeptides ~~comportant~~ un acide aminé cystéine extracytoplasmique, permettant la formation ~~de ponts~~ disulfures (cf. Figure 4)
- polypeptide de ~~masse~~ moléculaire apparente comprise entre 12 et 16 kDa environ,
- polypeptides présentant au moins un acide-aminé tyrosine
- 15 phosphorylable (cf. Figure 3C).

Etant données les fortes similarités existant entre les molécules KARAPs identifiées à 12, 14 et 16 kDa, nous avons supposé que ces trois formes moléculaires représentaient des degrés de phosphorylation différents du même polypeptide KARAP, dont le poids moléculaire ne pouvait dépasser 12 kDa.

- 20 De plus, une caractéristique majeure des KARAPs réside dans leur association sélective avec les KARs et non pas avec les KIRs. Etant donné que, contrairement aux KIRs, les KAR possèdent un acide aminé chargé transmembranaire (lysine : K), et que cette particularité est aussi à la base de l'association des polypeptides à ITAM présents dans les complexes CD3/TCR,
- 25 BCR, FcεRI et FcγRIIIA (CD16), nous avons orienté notre stratégie d'identification du gène KARAP en considérant que KARAP est un nouveau membre de la famille des polypeptides transmembranaire à ITAM. Ces derniers partagent en effet avec KARAP les mêmes caractéristiques :

- polypeptides comportant un acide aminé cystéine extracytoplasmique (C), permettant la formation de ponts disulfures,

- polypeptide de faible masse moléculaire ne dépassant pas 25 kDa,

- polypeptides présentant au moins un acide aminé tyrosine phosphorylable comprise dans un motif ITAM: YxxL/Ix₆₋₈YxxL/I, et

- présence d'un acide aminé chargé transmembranaire

Nous avons ainsi élaboré une stratégie bio-informatique d'identification d'un gène à partir des banques de cDNA publiques disponibles sous la forme EST, GENBANK, SWISSPROT et EMBL. Nous avons utilisé 2 approches différentes:

1/ Nous avons traduit selon les 6 phases de lecture l'ensemble des EST, en ne retenant que les peptides ayant entre 50 et 200 acides aminés (poids moléculaire envisagé compris entre 5,5 et 22 kDa). Sur cette sous-base, nous avons appliqué plusieurs critères de sélection :

- existence d'une région transmembranaire prédite d'au moins 10 acides aminés, commençant avant l'acide aminé 30, selon la méthode d'Argos (Rao & Argos, 1986, Biochem. Biophys. Acta, 869, 197-214). En effet, par homologie avec les polypeptides à ITAM tels que CD3 ζ et Fc ϵ RI γ , la majeure partie de la séquence KARAP est prédite comme étant intracytoplasmique.

- recherche un motif ITAM (Y-x-x-[IL]-x(6,8)-Y-x-x[IL]) en position C-terminale de la zone transmembranaire.

- présence dans la région transmembranaire d'un acide aminé chargé (R, K, D, E).

- présence d'un acide aminé cystéine (C) en position C-terminale de la zone transmembranaire.

2/ Recherche des entrées EST (analyse faite également avec EMBL, GENBANK et SWISSPROT) présentant des similarités de séquences avec

l'entrée CD3Z_HUMAN. Le programme utilisé est TBLASTN (version 1.4.11; Altschul, Stephen F., Warren Gish, Webb Miller, Eugene W. Myers, and David J. Lipman, 1990, J. Mol. Biol. 215, 403-10) ou TBLASTN (version 2.0.3; Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui
 5 Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman, 1997, Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402). Sur ces entrées similaires, nous avons ensuite appliqué les critères de sélection utilisés dans la première approche.

En combinant ces deux approches bio-informatiques et après avoir successivement déterminé à l'aide de profils d'hydrophobicité (programmes
 10 Genworks, DNA Strider) les régions leader, transmembranaires, intra- et extracytoplasmique des molécules candidates, nous avons obtenu un nombre important de séquences correspondant potentiellement à celle de KARAP. Parmi ces séquences, la séquence correspondant au numéro d'accèsion AA242315 sur Genbank nous est apparu comme la séquence du gène KARAP
 15 de la souris (SEQ ID n°1). La figure n°7 représente la séquence ADN (SEQ ID n°1) d'un polypeptide KARAP selon l'invention ; cette séquence est la séquence du gène KARAP murin. En effet, la traduction de la séquence nucléotidique donne un cadre de lecture ouvert de 396 nucléotides (SEQ ID n°2). Ce résultat est illustré par la figure n°8 où est représenté la partie de séquence
 20 nucléotidique du gène KARAP (SEQ ID n°1) qui est comprise entre la séquence leader (exclue) et le codon stop, et où est également représentée, en-dessous de cette séquence nucléotidique, la séquence en acides aminés (code à 1 lettre) correspondante (SEQ ID n°2, code à 3 lettres), c'est-à-dire la séquence en acides aminés de la protéine KARAP murine mature selon
 25 l'invention (SEQ ID n°2). L'analyse standard de cette séquence prévoit une protéine mature de 87 acides aminés (masse moléculaire de 9,6 kDa), une partie extracytoplasmique de 16 acides aminés (Q1-G16), une partie

transmembranaire de 24 acides aminés (V17-G40), et une partie intracytoplasmique de 47 acides aminés (R41-R87). Conformément à notre stratégie de recherche, la partie extracytoplasmique comprend au moins un acide aminé cystéine (en fait deux, C8 et C10), un acide aminé

5 transmembranaire (D25), et un ITAM intracytoplasmique (Y65QELQGQRHEVY76SDL). La figure 9 illustre les comparaisons qui peuvent être faites par alignement de séquences entre les polypeptides à ITAMs préalablement décrits et les polypeptides selon l'invention possédant un (ou des) motifs ITAM, et indique la séquence ITAM consensus résultante : la figure 9

10 représente l'alignement des ITAMs de polypeptides à ITAM humains (six CD3, un Ig α , un Ig β , Fc ϵ RI γ et Fc ϵ RI β) et d'un motif ITAM du polypeptide KARAP murin (SEQ ID n°2) identifié ci-dessus selon l'invention (indiqué "KARAP" sur cette figure 9). Sur cette base de comparaison avec les ITAMs préalablement décrits (Figure 9), il nous a été permis d'envisager l'association des KARAP

15 phosphorylées avec des protéine tyrosine kinases à groupement SH2 en tandem (telles que ZAP-70 et p72Syk). L'association des KARAPs avec des protéines de fusion recombinantes correspondant aux groupements SH2 de ZAP-70 (préparation décrite dans: Olcese L., Lang P., Vély F., Cambiaggi A., Marguet D., Bléry M., Hippen K. L., Biassoni R., Moretta A., Moretta L., Cambier J.

20 C., Vivier E. 1996, J. Immunol. 156:4531-4534), a été vérifié *in vitro*: ces expériences ont été réalisées comme décrit dans la Figure 3A, ligne 3, mais les lysats cellulaires ont été adsorbés par la protéine de fusion recombinante correspondant aux groupements SH2 de ZAP-70, au lieu de l'anticorps anti-CD158. Ainsi KARAP est une nouvelle molécule transmembranaire à ITAM

25 qui s'associe aux KAR et qui sous une forme tyrosine phosphorylée s'associe à ZAP-70. KARAP est donc un nouvel élément de transduction des lymphocytes T et NK. Il est possible que KARAP ou des analogues de KARAP s'associent

aussi aux isoformes activatrices des récepteurs à ITIM, et servent dans ces complexes multimoléculaires de sous-unité de transduction des signaux émis lors de l'engagement du récepteur.

Une méthode particulièrement appropriée pour déterminer ou contrôler qu'un polypeptide candidat, dont on connaît la séquence, correspond à une protéine KARAP selon l'invention consiste à produire un anticorps contre une partie caractéristique de ce polypeptide candidat (par exemple une région intracytoplasmique comprenant au moins un motif ITAM ou une région extracytoplasmique), et à vérifier que cet anticorps reconnaît, sur une cellule fonctionnelle, une cellule KAR⁺ fonctionnelle par exemple, une cible qui se trouve associée au récepteur pour lequel le polypeptide candidat est supposé être le KARAP (c'est-à-dire, dans le cas de cellules KAR⁺, à vérifier que l'anticorps reconnaît une cible qui se trouve associée à un récepteur KAR).

Cette méthode d'identification de polypeptides KARAP selon l'invention consiste ainsi notamment à :

- produire un anticorps mono- ou polyclonal dirigé contre ce polypeptide candidat, et en particulier contre une région de ce polypeptide candidat qui comprend au moins un motif ITAM (par exemple, dans le cas de la protéine KARAP murine identifiée ci-dessus, un anticorps dirigé contre une région de la partie extracytoplasmique (SEQ ID n°3) ou de la partie intracytoplasmique (SEQ ID n°5) de la SEQ ID n°2),

- mettre en contact cet anticorps avec un lysat de cellules, possédant, sous une forme fonctionnelle, le récepteur activateur ou non inhibiteur pour lequel le polypeptide candidat est supposé constituer le KARAP, par exemple des cellules KAR⁺ fonctionnelles telles que des cellules NK ou T, dans des conditions douces permettant des réactions de liaison de type antigène-anticorps,

- identifier le polypeptide candidat comme étant un polypeptide KARAP selon l'invention lorsque dans les produits de réaction éventuellement formés se trouvent un produit de masse moléculaire apparente proche de celle d'un KAR (environ 50 kDa) et un produit de masse moléculaire apparente proche de celle du polypeptide candidat notamment entre 10 et 16 kDa environ).

Cette méthode d'identification selon l'invention peut notamment être réalisée.

- en mettant en contact ledit anticorps comme ci-dessus décrit,
- faire précipiter les produits de réaction éventuellement formés dans des conditions douces de détergent préservant les complexes moléculaires (par exemple digitonine à 1%, voir ~~exemple~~ 1 ci-dessus),
- mesurer la masse moléculaire des produits précipités, par exemple par migration électrophorétique ~~en présence~~ des marqueurs de masse moléculaire sur un gel de polyacrylamide ~~en conditions dénaturantes~~, et
- en identifiant le ~~polypeptide~~ candidat comme étant un polypeptide KARAP selon l'invention ~~comme~~ ci-dessus décrit.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: I.N. S.E. R.M.
- (B) RUE: 101, rue de Tolbiac
- (C) VILLE: PARIS CEDEX 13
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 75654

(ii) TITRE DE L'INVENTION: NOUVEAUX POLYPEPTIDES ASSOCIES A DES RECEPTEURS ACTIVATEURS ET LEURS APPLICATIONS BIOLOGIQUES

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 5

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D'EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: Patent In Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 517 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mus musculus
- (B) SOUCHE: C57 BL/6J

(vii) SOURCE IMMEDIATE:

- (A) BIBLIOTHEQUE: scores mouse 3NME12 5'
- (B) CLONE: 671865

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

```

GGTCACACCA GGTCCACCA GCCCTGGAC TGTGGTGTCC AGTGCATATC TGGCCACCAT      60
GGGGCTCTGG AGCCTCCTGG TGCCTTCTGT TCCTTCCTGT CCTCCTGACT GTGGGAGGAT      120
TAAGTCCCGT ACAGGCCAG AGTGACACTT TCCAAGATG CGACTGTTCT TCCGTGAGCC      180
CTGGTGTACT GTCTGGGATT GTTCTGGGTG ACTTGGTGTT GACTCTGCTG ATTGCCCTGG      240
CTGTGTACTC TCTGGGCCGC CTGGTCTCCC GAGGTCAAGG GACAGCGGAA GGGACCCGGA      300
AACAAACAT TGCTGAGACT GAGTCGCCTT ATCAGGAGCT TCAGGGTCAG AGACATGAAG      360
TATACAGTGA CCTCAACACA CAGAGGCAAT ATTACAGATG AGCCCACTCT ATGCCCATCA      420
GCGGCCTGAT GCCCGGATCC GGTCAATCCA GATGCCTACT CAACAAGCCC TCTCTGAGAT      480
CAGGACTCCC GTTGAATAC AGATCCACAG GGTACCT                                517

```


(3) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 87 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (C) NOMBRE DE BRINS:
 (D) CONFIGURATION: non-connue
- (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine
- (vii) SOURCE IMMEDIATE:
 (B) CLONE: KARAP souris
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Ser | Asp | Thr | Phe | Pro | Arg | Cys | Asp | Cys | Ser | Ser | Val | Ser | Pro | Gly |
| 1 | | | | 5 | | | | 10 | | | | | 15 | | |
| Val | Leu | Ser | Gly | Ile | Val | Leu | Gly | Asp | Leu | Val | Leu | Thr | Leu | Leu | Ile |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Ala | Leu | Ala | Val | Tyr | Ser | Leu | Gly | Arg | Leu | Val | Ser | Arg | Gly | Gln | Gly |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Thr | Ala | Glu | Gly | Thr | Arg | Lys | Gln | His | Ile | Ala | Glu | Thr | Glu | Ser | Pro |
| | | 50 | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Tyr | Gln | Glu | Leu | Gln | Gly | Gln | Arg | His | Glu | Val | Tyr | Ser | Asp | Leu | Asn |
| 65 | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | |
| Thr | Gln | Arg | Gln | Tyr | Tyr | Arg | | | | | | | | | |
| | | | | 85 | | | | | | | | | | | |

(4) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 16 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (C) NOMBRE DE BRINS:
 (D) CONFIGURATION: non connue
- (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide
- (vii) SOURCE IMMEDIATE:
 (B) CLONE: KARAP souris partie extracytoplasmique
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Ser | Asp | Thr | Phe | Pro | Arg | Cys | Asp | Cys | Ser | Ser | Val | Ser | Pro | Gly |
| 1 | | | | 5 | | | | 10 | | | | | 15 | | |

Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Arg Gln Tyr Tyr Arg
35 40 45

REVENDICATION

1. Polypeptide caractérisé en ce que sa séquence en acides aminés est
5 essentiellement constituée par la SEQ ID n°2.

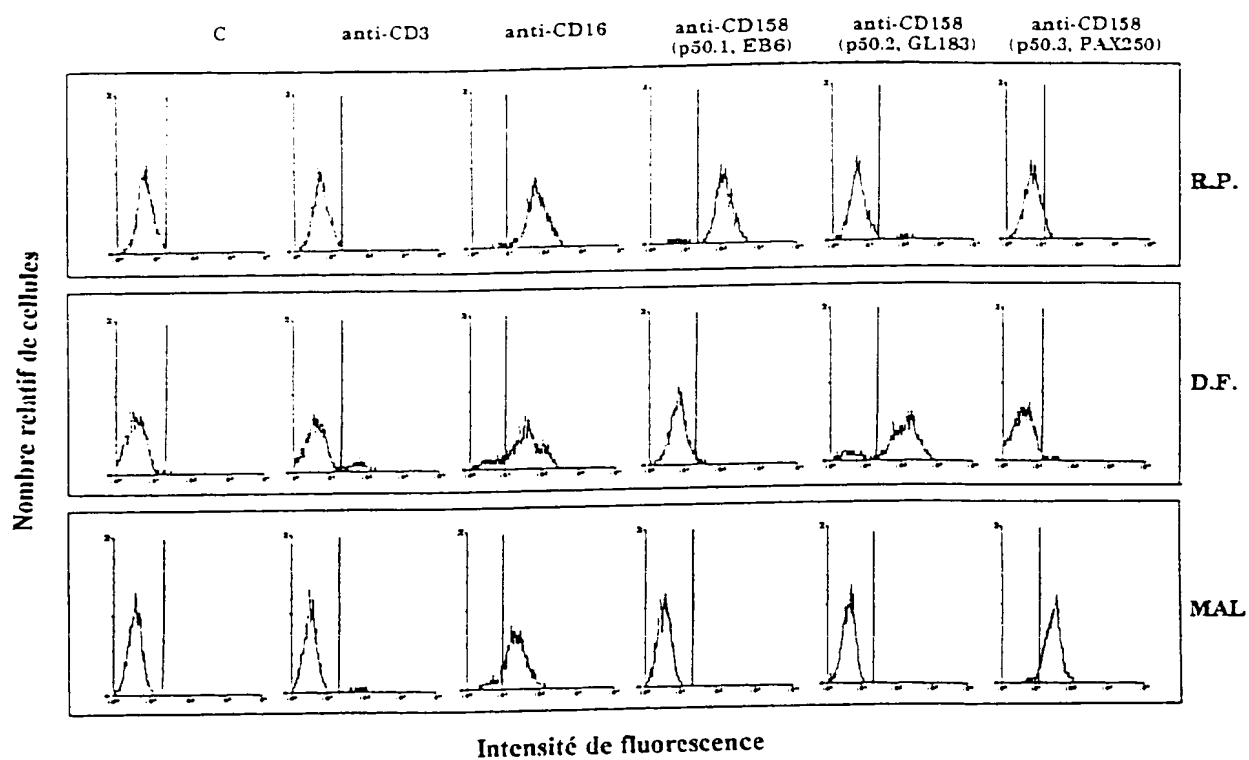


Figure 1A

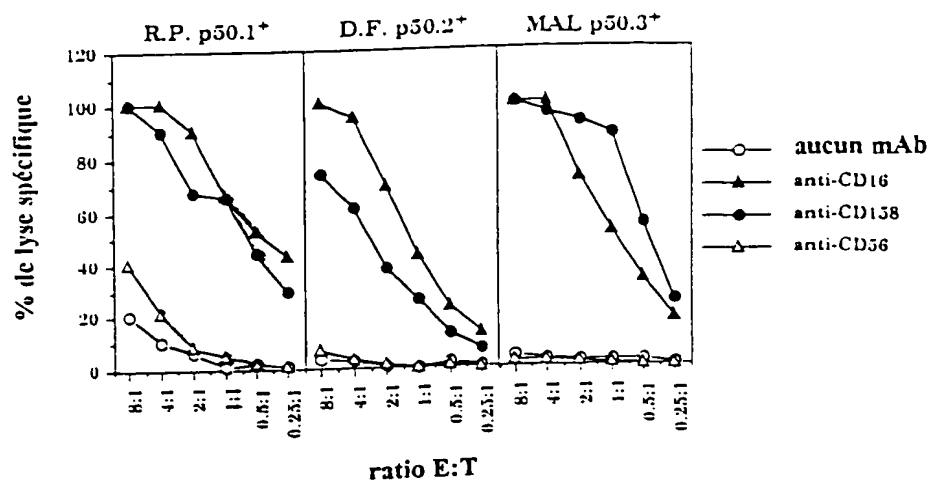
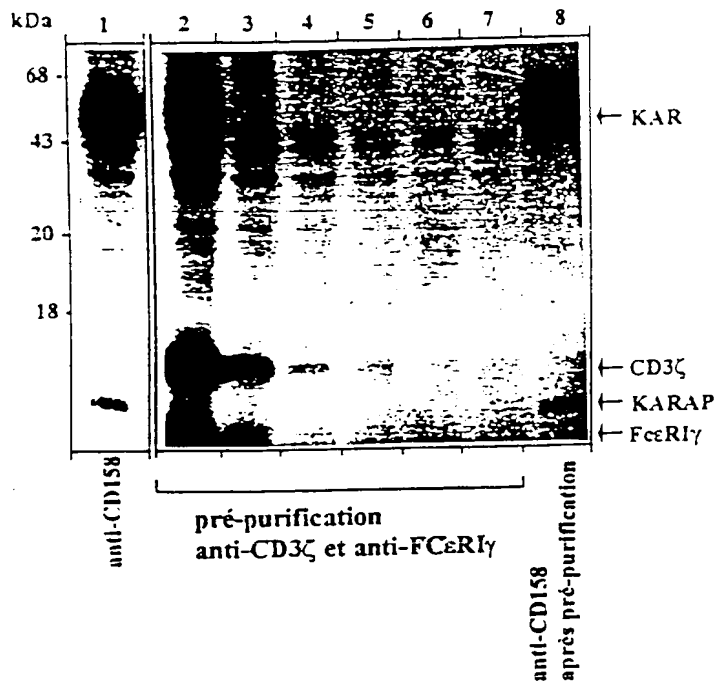


Figure 1 B

A



B

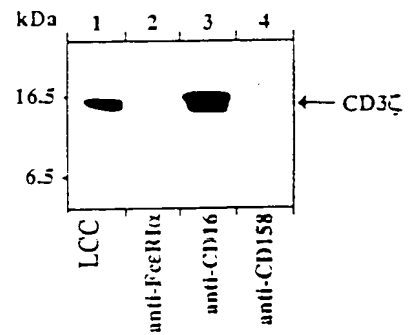
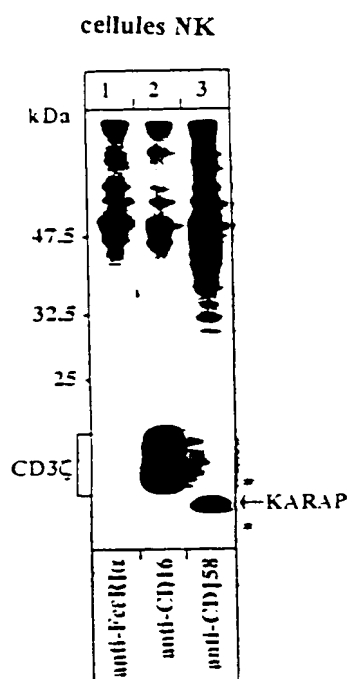
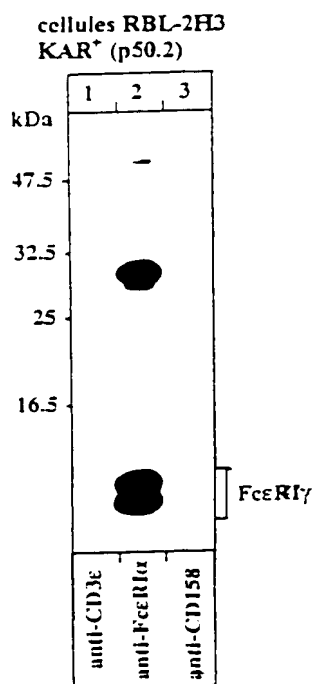


Figure 2 A, B

A



B



C

Analyse des acides phosphoaminés

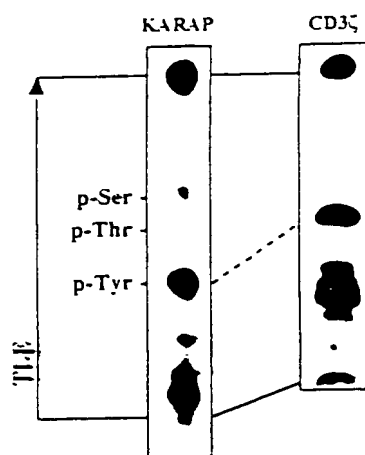


Figure 3 A, B, C

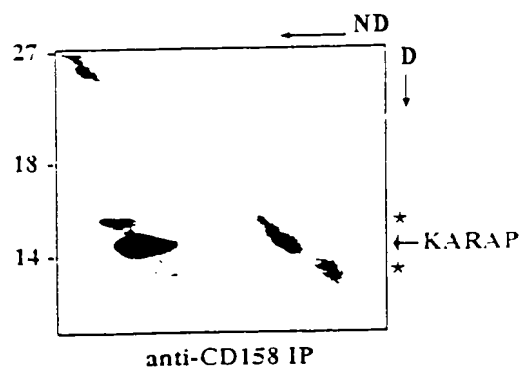
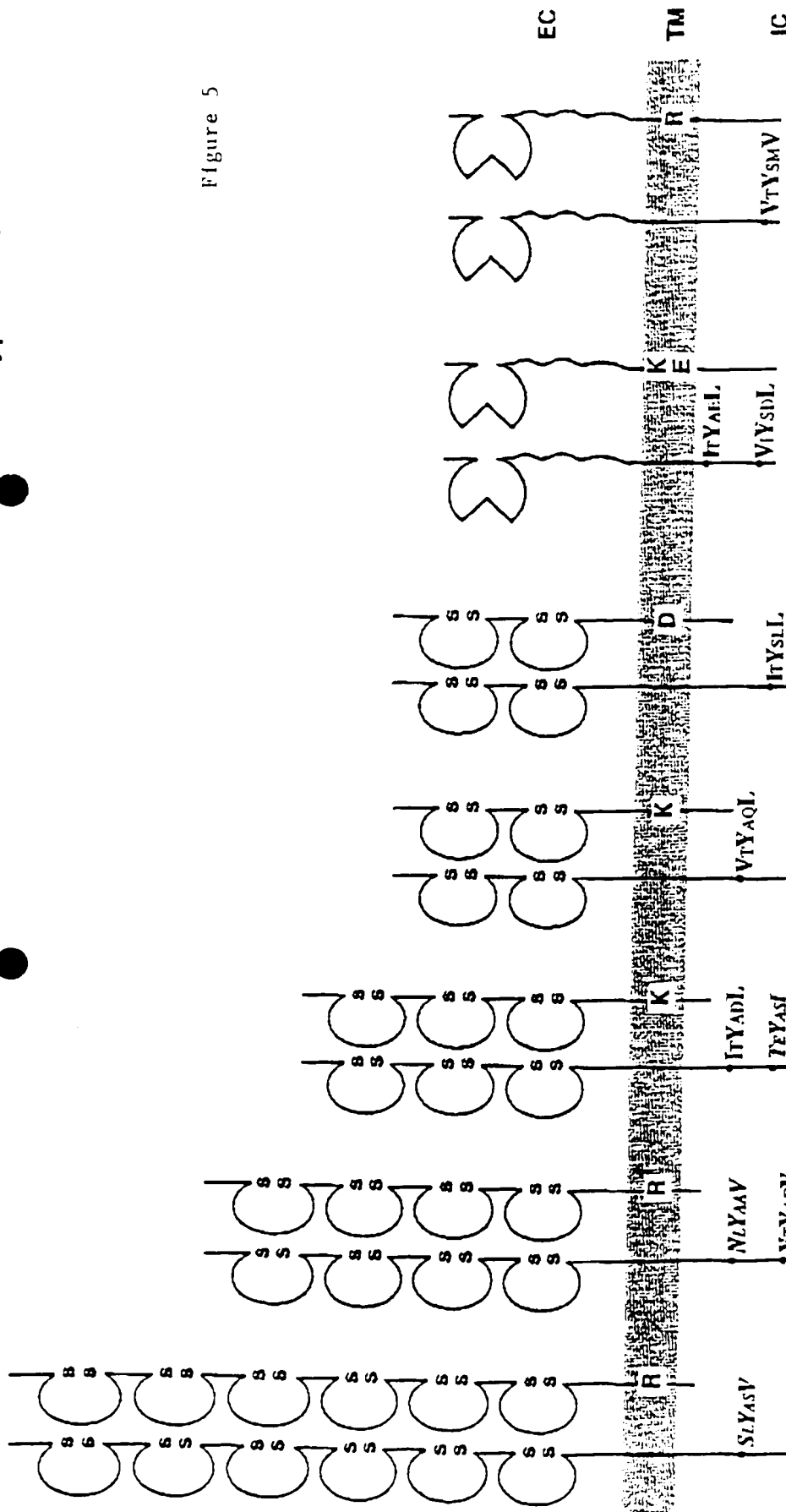


Figure 4

Figure 5



mLy-49A
mLy-49B
mLy-49C
mLy-49E
mLy-49F
mLy-49G mLy-49D
mLy-49I mLy-49H

NKG2A NKG2C
NKG2B NKG2D

FcγRIIB FcγRIII

KIR KAR
(p58) (p50)

SIRPα SIRPβ

ILT2 ILT1

mPIR-B mPIR-A

Cellules NK
Cellules T

Cellules NK
Cellules T

Monocytes
Cellules NK

Cellules NK
Cellules T

Cellules
Hématopoiétiques

Cellules
Hématopoiétiques
et non-
hématopoiétiques

Cellules
Hématopoiétiques

Cellules
hématopoiétiques

Récepteurs de cellules NK: p58/p50 pour des molécules du CMI de classe I.

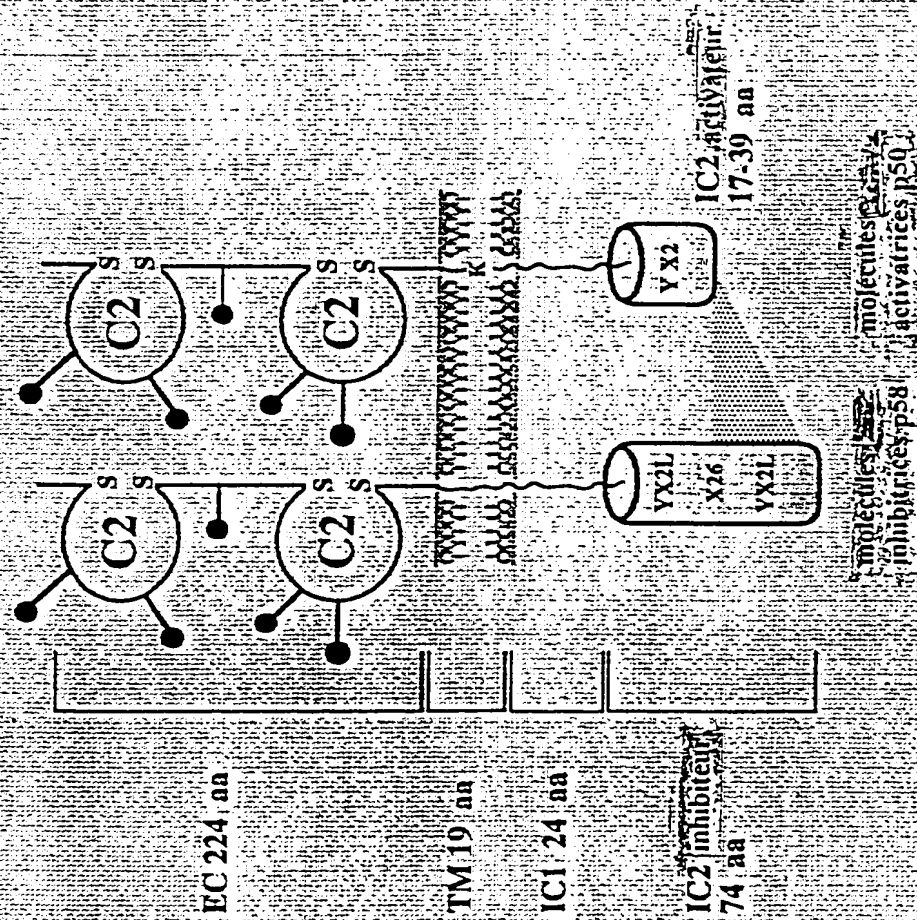


Figure 16

Figure 7

1 ggtcacacca ggtccacca gccctggac tgttgttcc agtgcatac tggccacat
61 ggggtctgg agcctctgg tgccttctgt tccttctgt cctctgact gtgggaggat
121 taagtccgt acaggcccag agtgacact tccaagatg cgactgtct tccgtgagc
181 ctggtgtact gtctgggatt gttctgggtg acttggtgt gactctgtg attgccctg
241 ctgtgtact tctggccgc ctggtctcc gaggtcaagg gacagcggaa gggacccgga
301 aacaacacat tctgagact gagtcgcctt atcaggagct tcagggtcag agacatgaag
361 tatacagtga cctcaacaca cagaggcaat attacagatg agcccactct atgcccata
421 gcggcctgat gcccgatcc ggtcattcca gatgcctact caacaagccc tctctgagat
481 caggactccc gttggaatac agatccacag ggtacct

Figure 8

1/1

cag agt gac act ttc cca aga tgc gac tgt tct tcc gtg agc cct ggt gta ctg tct ggg
 Q S D T F P R C D C S S V S P G V L S G

61/21

31/11

91/31

att gtt ctg ggt gac ttg gtg ttg act ctg ctg att gcc ctg gct gtg tac tct ctg ggc
 I V L G D L V L T L L I A L A V Y S L G

121/41

151/51

cgc ctg gtc tcc cga ggt caa ggg aca gcg gaa ggg acc cgg aaa caa cac att gct gag
 R L V S R G Q G T A E G T R K Q H I A E

181/61

211/71

act gag tcg cct tat cag gag ctt cag ggt cag aga cat gaa gta tac agt gac ctc aac
 T E S P Y Q E L Q G Q R H E V Y S D L N

241/81

aca cag agg caa tat tac aga

T Q R Q Y Y R

Figure 9

Les polypeptides à ITAM	
CD3 ζ_1	YneLnlgrrree-YdvL
CD3 ζ_2	YneLqkdkmaeaYseI
CD3 ζ_3	YqgLstatkdt-YdaL
CD3 γ	YqpLkdreddq-YshL
CD3 δ	YqpLrdrddaq-YshL
CD3 ϵ	YepIrkgqrdl-YsgL
Ig α (CD79a)	YedIsrglqgt-YqdV
Ig β (CD79b)	YegLdidqtat-YedI
Fc ϵ RI γ	YtgLdtrnqet-YetL
Fc ϵ RI β	YeeLniysat--YseL
KARAP	YqeLqgqrhev-YsdL
Consensus	Y--L-----Y--L I I

